

Aus der dermatologischen Universitätsklinik Basel (Vorsteher: Prof. W. Lutz)
Arbeit unter Leitung von P.D. Dr. R. Schuppli

Studien zum Problem der Pigmentbildung in der Haut

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

HANS RUDOLF LIEBETRAU

pract. Arzt von Olsberg



1951

Verlag von S. Karger in Basel

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. *W. Lutz*.

Tag der Promotion: 2. März 1951.



Sonderdruck aus «Dermatologica» Vol. 103, No. 2

Die Forschung nach den Faktoren, welche die Bildung des Hautpigmentes bedingen, wurde 1915–16 durch die Arbeiten von *Bruno Bloch*¹ wesentlich gefördert. Es gelang ihm, mit einem neuen Reagens, dem 3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) in den sich pigmentierenden Epidermiszellen histologisch die Entstehung eines schwarzen Farbstoffes, und zwar wahrscheinlich des Melanins teils in diffuser, teils in körniger Form nachzuweisen, ein Befund, der zur Aufstellung seiner Dopa-Theorie über die Pigmentbildung führte.

Das Wesentliche seiner Schlußfolgerungen läßt sich etwa so wiedergeben: in den zur Pigmentbildung fähigen Epidermiszellen ist ein Ferment enthalten – das von *Bloch* als Dopa-Oxydase bezeichnet wurde, weil es das Dioxyphenylalanin in einen schwarzen Farbstoff, d. h. Melanin umwandelt – auf dessen Tätigkeit die Bildung des Melanins zurückzuführen ist. Die Vorstufe oder die Vorstufen, die den pigmentbildenden Zellen auf dem Blutweg zugeführt werden, sind farblos und stehen chemisch wahrscheinlich dem Adrenalin nahe.

Diese Auffassung ist jedoch nicht unwidersprochen geblieben. Die mit der Dopa-Theorie, wie die mit der Pigmentbildung im ganzen verknüpften Fragen sind zuletzt 1940 von *Meirowsky*², der sich schon um die Jahrhundertwende intensiv morphologisch mit ihnen beschäftigt hatte, sehr übersichtlich zusammengefaßt worden. Auch die Einwendungen, gegen die Ansichten von *Bloch* finden sich dort angeführt. In bezug auf die Vorstufen des Pigments weist *Meirowsky* vor allem auf seine 1906 publizierten Untersuchungen hin, daß nach intensiver Belichtung eine auffallende Vermehrung der Nukleolar-körperchen im Zellkern zu sehen sei, die dann in Form kleinster

Körner in das Protoplasma der Zelle austreten und dort in braune und schwarze Pigmentkörper übergehen.

Im Hinblick auf die enzymatischen Prozesse bezweifeln verschiedene Autoren die Spezifität der Dopa-Oxydase. Sie sei besser als Polyphenoloxydase zu bezeichnen, da auch andere Phenolderivate durch sie oxydiert würden.

Einen neuen Gesichtspunkt in die Diskussion um die Pigmentgenese brachten die Untersuchungen von *Zeller*, der bei der Wirkung eines ganz andern Fermentsystems Pigmentbildung beobachten konnte. Wie er in seiner Inauguraldissertation «Über den Chemismus des Arginin- und Histaminstoffwechsels»³ berichtet, gelang es ihm, bei der Spaltung von Histamin durch Histaminase-Präparate eine schwarz-braune Färbung zu erhalten, deren Intensität ungefähr der Spaltung des Histamins parallel ging. Fügte er dem Ansatz Histamin-Histaminase Dopa hinzu, so wurde die Schwärzung des Dopa gehemmt.

Die Frage, ob Histamin eine Vorstufe des Melanins sein könnte, wurde von *Robert* weiterverfolgt. *Robert* und *Zeller*⁴ führen in einer gemeinsamen Arbeit die Gründe an, die für eine solche Theorie der Pigmentbildung sprechen, und stützen sich dabei zum Teil auf klinische Beobachtungen, zum Teil auf Bestimmungen der Diaminoxydase (Histaminase) bei Pigmentanomalien. So läßt sich zum Beispiel in der Gravidität, bei der ja Hyperpigmentierungen regelmäßige Begleiterscheinungen sind, eine bedeutende Vermehrung der Diaminoxydase feststellen. Auch in zwei Fällen von Morbus Addison fand sich die Diaminoxydase vermehrt. Demgegenüber wurde im Blutserum von Patienten mit Vitiligo eine Verminderung der Aktivität der Diaminoxydase nachgewiesen und *Robert* fand später⁵ im Inhalt von Kantharidenblasen, die auf vitiliginöser Haut erzeugt worden waren, weniger Diaminoxydase, als im Serum von Blasen, die über normaler Haut hervorgerufen worden waren. Die Entstehung des Pigments selber wäre nach *Zeller* in der Weise zu erklären, daß Histamin beim Abbau durch die Diaminoxydase zunächst in eine Aldehydvorstufe übergehen würde, die noch keinen Farbstoffcharakter aufweist, sondern erst durch weitere fermentative Prozesse oder durch eine nicht enzymatische Oxydation in das Pigment umgewandelt würde. Diese Reaktion wurde allerdings nicht wie die Dopa-reaktion im histologischen Schnitt an der Epidermiszelle nachgewiesen.

Es schien uns daher zweckmäßig, zunächst die Angaben von *Zeller*, die unseres Wissens bis jetzt nicht weiter verfolgt worden waren, einer Nachprüfung zu unterziehen.

1. Zur Frage der Pigmentbildung aus Histamin

In *Zellers* Arbeiten, sowohl in der Originalfassung seiner Dissertation⁶, als auch in der für den Druck gekürzten Fassung⁷, finden sich keine genaueren Angaben, auf welche Weise es ihm möglich war, die Pigmentbildung zu erhalten. Die allgemeine Vorschrift lautet:

Gewinnung eines melaninähnlichen Körpers: Aktiver Extrakt wird mit Phosphatpuffer und Histamin unter Luftdurchleiten 24 Stunden bebrütet, dann mit gesättigter Sodalösung stark alkalisch gemacht und ein kräftiger Luftstrom durchgeblasen. Nach eintägigem Stehen bildet sich ein schwarzer Niederschlag, der leicht abfiltriert werden kann.

Wir stellten deshalb die Fermentpräparate, die Pufferlösungen und die Histaminlösung so her, wie sie *Zeller* für seine übrigen Versuche mit Histaminase benötigte.

A. Die Herstellung des Fermentpräparates: frische Schweinenieren werden von Fett und Mark befreit und fein zerkleinert. Der Gewebsbrei wird mit der vierfachen Menge reinen, eisgekühlten Acetons kräftig geschüttelt und filtriert. Der Filterrückstand wird an der Luft getrocknet.

B. Die verwendeten Fermentlösungen: Mit dem so gewonnenen Aceton-Trockenpulver wurden folgende Extrakte hergestellt:

1. mit Aqua destillata 1:1
2. mit physiologischer Kochsalzlösung 1:2 und 1:10
3. mit 5%iger Kochsalzlösung 1:1
4. mit Phosphatpuffer nach *Soerensen* von verschiedenem pH 1:1.

C. Zu diesen Extraktlösungen wurden verschiedene Mengen Histamin hinzugegeben (siehe Tabelle). In andern Versuchen verwendeten wir auch Torantil «Bayer», das eine aktive Histaminase enthalten soll. Diese Mischungen wurden mit gleichen Teilen Phosphatpuffer von verschiedenem pH versetzt. Danach wurden diese Lösungen bei 38 ° C während zweimal 24 Stunden mit Sauerstoff durchperlt. Nach 24 Stunden wurden diese Lösungen alkalisiert.

Die Aktivität der Nierenextrakte wurde in einzelnen Fällen am Meerschweinchendarm kontrolliert. Bei Zusatz von 1 mg Histamin zu den Extrakten ließ sich ein vollständiges Verschwinden des Histamins nach 36 Stunden feststellen, so daß damit die Aktivität sicher nachgewiesen war. Torantil bewirkte eine nur geringe Abnahme des Histamingehaltes.

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Ergebnis

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, daß in keinem der durchgeführten Versuche sich das Auftreten eines schwarzen Farbstoffes beobachten ließ, trotzdem wir über sicher wirksame, Histaminase enthaltende Extrakte verfügten. Wir versuchten durch Variation der

TABELLE 1

Übersicht über die Versuchsanordnung mit den Histaminaseextrakten

Puffer pH	Ex- trakt	Histamin	Torantil	Dopa	Vit. C	CuSO ₄	Pigm. 1 × 24 h	alkali- siert	Pigm. 2 × 24 h	Pigm. 4 × 24 h
5,3	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
5,9	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
6,5	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
6,8	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
7,0	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
7,2	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
7,4	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
8,0	1 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻² g					0	pH 9	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻² g					0	pH 10	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g					0	pH 9	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g					0	pH 10	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻⁴ g					0	pH 9	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻⁴ g					0	pH 10	0	
7,4	2 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	0
7,4	2 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	0
7,4	3 ccm	1,10 ⁻² g					0	+	0	0
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	0
7,4	4 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	0
7,4	4 ccm	1,10 ⁻² g					0	+	0	0
7,4	5 ccm	1,10 ⁻³ g					0	+	0	0
7,4	3 ccm						0	+	0	
7,4		1,10 ⁻² g					0	+	0	
7,4		1,10 ⁻³ g					0	+	0	
7,4		1,10 ⁻³ g	2 Amp.				0	+	0	
7,4	3 ccm		1,10 ⁻² g				+++	+	+++	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g	1,10 ⁻² g				++	+	+++	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻² g	1,10 ⁻² g				++	+	+++	
7,4			1,10 ⁻² g				+++	+	+++	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻² g		100 mg			0	+	0	
7,4	3 ccm			100 mg			0	+	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g			1,10 ⁻³ g	0	+	+	0	
7,4	3 ccm	1,10 ⁻³ g			1,10 ⁻⁴ g	0	+	+	0	

Mengenverhältnisse ein positives Resultat zu erzielen, indem wir die Menge des Puffers, des Extraktes und des Histamins änderten, Kupfer zusetzten, die Präparate länger einwirken ließen, oder schließlich bis pH 10 alkalisierten. Eine Pigmentbildung konnte aber nie erzielt werden. Dagegen konnten wir die Angabe von Zeller, daß sich die-

jenigen Ansätze, denen Dopa zugefügt worden war, anfänglich weniger rasch färbten, als die, welche nur Dopa allein enthielten, bestätigten. Am Schluß des Versuches war jedoch die Intensität der Färbung beider Ansätze gleich stark.

Wir müssen somit feststellen, daß wir die Befunde von *Zeller*, nach denen durch die Einwirkung von Diaminoxydase auf Histamin eine Melaninbildung erzielt werden kann, nicht reproduzieren konnten, sondern stets nur negative Resultate erhielten. Wir müssen außerdem beifügen, daß uns eine Pigmentbildung auf diesem Wege im Organismus selbst als nicht sehr wahrscheinlich vorkommt, weil die zu den Versuchen von *Zeller* benötigten Alkalitätsgrade im Körper selbst wohl nie erreicht werden können.

Unter diesen Umständen scheint uns der Satz in *Zellers* Arbeit: «Dieses Pigment ist sicher kein reines Oxydations- und Polymerisationsprodukt des Histamins allein. Je reiner eine Spaltlösung ist, desto geringer ist seine Bildung», von besonderer Bedeutung.

Die Frage der Pigmentbildung aus Histamin scheint uns daher noch weiterer Bearbeitung zu bedürfen und, wie die Dinge heute stehen, keine geeignete Basis für Diskussionen über die Pigmentbildung zu bilden.

2. Kupfer und Pigmentbildung

Nachdem wir bei der Nachprüfung von *Zeller's* Untersuchungen zu ganz negativen Resultaten gelangt waren, versuchten wir das Problem der Pigmentbildung von einer anderen Seite her anzufassen.

Es ist bekannt, daß verschiedene Phenoloxidasen, die nach den bisherigen Ergebnissen doch in erster Linie als Ferment für die Pigmentbildung in Betracht kommen, und zu denen auch die Dopa-oxydase gezählt werden muß, Kupfer enthalten ^{7, 8, 9, 10}. Über Beziehungen zwischen Kupfer und Pigmentbildung finden sich in der Literatur bereits mehrfach Hinweise:

Keil und *Nelson* ¹¹ stellten 1931 bei Untersuchungen über die alimentäre Rattenanämie fest, daß sich bei dunkelhaarigen Tieren eine Graufärbung des Felles einstellte, wenn sie längere Zeit auf kupferfreie Diät gesetzt wurden. *Gorter* ¹² bestätigt die Tatsache, daß durch kupferfreie Diät das Fell von Ratten, ferner von Kaninchen und Katzen zur Depigmentierung gebracht werden kann; er konnte diese Entfärbung durch Kupferzusatz wieder rückgängig machen. *Cunningham* ¹³ wies nach, daß die Haut der dunkelhaarigen Tiere mehr Kupfer enthält als die der Tiere mit heller Behaarung, wobei sich der Kupfergehalt auf die Epidermis konzentriert. *Sarata* ¹⁴ fand den Kupfergehalt in den pigmentierten Haaren höher als in den unpigmentierten. Er führte die Untersuchungen an gefleckten Hunden und Katzen

durch. *Yosikawa*¹⁵ verglich bei Japanern den Kupfergehalt von weißen und pigmentierten Haaren desselben Menschen, und gelangte ebenfalls zum Ergebnis, daß er in den pigmentierten höher war als in den weißen. Für Europäer konnte *Cohen*¹⁶ diesen Befund ebenfalls bestätigen.

Ferner wurden Untersuchungen *in vitro* durchgeführt. Bei der Kontrolle des Einflusses eines Zusatzes von Hautextrakten auf die Oxydation von Dopalösungen ergab sich eine beschleunigte Pigmentbildung, wenn den Extrakten Kupfer zugesetzt wurde. Die Oxydation des Dopa verläuft jedoch auch in extraktfreien Lösungen rascher, wenn Kupfer und gewisse andere Metalle zugesetzt werden.

*Flesch*¹⁷ bestätigte zunächst die Befunde von *Sarata* an pigmentierten und unpigmentierten Haaren gefleckter Tiere. Dann prüfte er an reinen Dopalösungen den Einfluß verschiedener Schwermetallsalze auf die Geschwindigkeit und die Intensität der Schwärzung. Die einzelnen Metalle ließen sich entsprechend ihrer abnehmenden Wirksamkeit in folgender Reihe ordnen: Cu, Co, Ni, Mn, Pb, Fe. Wurden nun die Haare verascht und der Dopalösung beigegeben, so führte der Zusatz der Asche dunkler Haare zu einer stärkeren Beschleunigung der Oxydation als der Zusatz der weißen Haare. In der Epidermis war mehr Kupfer festzustellen als im Corium. Hingegen fand sich in dieser Beziehung kein Unterschied zwischen der Haut des Negers und des Weißen. Kupferbestimmungen im Harding-Passey-Melanom und in daraus hergestelltem Melanin zeigten, daß das Melanin 4–13mal mehr Kupfer enthielt als das Tumorgewebe, von dem es stammte.

Auch *Schuppli*¹⁸ fand in fermentfreien Dopalösungen eine Beschleunigung der Oxydation durch CuSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, FeSO_4 , und MnSO_4 . Bei der intracutanen Injektion beim Blauwienerkaninchen ergab die einmalige Injektion von wässriger 1%iger Kupfersulfatlösung eine verstärkte Pigmentation. Im Gegensatz zu den Versuchen *in vitro* ergaben die Injektionen der andern Metallsalze keine Pigmentierung. Versuche in fermentfreiem Milieu dürfen deshalb nicht einfach auf die Verhältnisse im lebenden Organismus übertragen werden. Der Sauerstoff des Gewebes allein genügt offenbar zur Oxydation des Melanogens nicht, es muß in der Haut ein Faktor vorhanden sein, der durch Kupfer aktiviert wird. Es dürfte sich dabei am ehesten um ein Ferment handeln. *Robert*¹⁹ sah *in vitro* ebenfalls eine Verstärkung der Dopareaktion durch Ag, Co, Mn, Au, Fe III, Cu, während andere Metalle ohne Einfluß waren. Im Gegensatz zu *Schuppli* fand er aber auch am Tier eine verstärkte Pigmentbildung durch Fe, Co, Ni, und As, und nicht nur durch Cu. Genaue Beobachtungen bei Auriasis, Hämosiderose und Siderose beim Menschen zeigten *Robert*²⁰ ferner, daß Ablagerungen der entsprechenden Metalle in der Haut nicht in jedem Fall zu Pigmentierungen führen, daß also noch ein anderer Faktor vorhanden sein muß, der für die Pigmentgenese verantwortlich ist. *Robert* vermutet, daß es sich dabei um Kupfer handeln könnte.

Auf einen Zusammenhang zwischen Pigmentbildung, Kupfer und Vitamin weist *Cornbleet* hin²¹: fermentfreie Dopalösung dunkelt rascher unter Kupferzusatz. Wird aber noch Vitamin C zugegeben, so wird die Pigmentbildung verlangsamt. Dies möglicherweise dadurch, daß der Sauerstoff zuerst für die Oxydation der Ascorbinsäure gebraucht wird. Daß bei der Pigmentbildung eine Schwermetallkatalyse eine Rolle spielen kann, vermutet *Schaaf*²². Mit der Methode von *Warburg*

fand er bei der Untersuchung von Preßsäften aus weißer und pigmentierter Meer-schweinhaut einen thermostabilen Faktor. Dieser beschleunigte die Oxydation von Brenzkatechin.

Neben diesen experimentellen Untersuchungen sind einige klinische Angaben von Interesse.

*Graciansky*²³ berichtet darüber, daß er in Fällen von Melanosis Riehl im Blut einen der Stärke der Pigmentation entsprechenden Kupfergehalt nachweisen konnte. Ferner ist bekannt, daß bei der physiologischen Hyperpigmentierung in der Gravidität im Blut vermehrt Kupfer angetroffen wird: *Krebs*²⁴, *Sarata*¹⁴, *Heilmeyer*²⁵, *Neuweiler*²⁶. *Shaffer*²⁷ untersuchte den Einfluß von Kupfersalzlösungen bei Vitiligo-kranken, denen er diese intracutan injizierte oder mit Salben applizierte. Er erhielt ein vollkommen negatives Resultat in den Vitiligoherden, und bei einigen Patienten eine schwache Pigmentbildung in pigmentierter Haut. Er führte dies auf die lokale Reizwirkung des Kupfersulfates zurück.

Aus all diesen Untersuchungen ist eindeutig ersichtlich, daß dem Kupfer eine besondere Bedeutung in der Pigmentgenese zukommt. Welcher Mechanismus aber dieser Wirkung zugrunde liegt, ist noch nicht sicher festgestellt.

So schreibt *Sarata*¹⁴ dem Kupfer lediglich einen katalytischen Effekt zu. Nach ihm wird Kupfer durch die Melanoblasten aufgenommen, verbleibt in ihnen, auch wenn das Pigment gebildet wurde, und wird mit diesen Zellen im Stratum corneum, in den Haaren, bzw. Federn aus dem Körper entfernt. Die Untersuchungen über den Mechanismus der *Antu*-(α -Naphthylthiourea-)Vergiftung bei Ratten zeigen, daß tatsächlich Stoffe, die kupferhaltige Fermente hemmen, depigmentieren können^{28, 29}. *Rothman*³⁰ denkt hingegen an einen andern Mechanismus. Er konnte die fermentative Oxydation von Tyrosin zu Melanin mittels Pflanzentyrosinase durch Haut-extrakte hemmen. Diese Hemmung wurde durch Stoffe, welche sich mit Sulfhydryl-gruppen verbinden, sowie durch Ultraviolettbestrahlung aufgehoben. Da nach *Figge*³¹ SH-Gruppen die Pigmentbildung in vitro hemmen, besteht die Möglichkeit, daß sie durch Kupfer und andere Metalle besetzt, und daher der enzymatischen Reaktion entzogen werden können, womit dann die hemmende Wirkung dieser Verbindung in Wegfall kommt.

Nachdem es nun durch die Methode von *Heilmeyer*²⁵ möglich ist, den Gehalt des Blutes an Kupfer sehr exakt zu bestimmen, haben uns diese Angaben veranlaßt, das Blut bei verschiedenen Pigment-anomalien auf seinen Kupfergehalt zu untersuchen.

3. Eigene Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Blut-kupfergehalt und Hautpigment

A. Methodik der Blutkupferbestimmung

Verwendung fand die Farbreaktion mit Natrium-Diäthylthiocarbamat nach *Callan* und *Henderson*³² in der von *Heilmeyer* angegebenen Modifikation.

Glasgeräte: Für eine Kupferbestimmung sind nötig: 2 Erlenmeyerkolben à 50 ccm, 2 Trichter 4 cm $\varnothing$, ein Schütteltrichter 75 ccm, Spezialreagensglas für Absorptiometer, Vollpipetten und Bureten, Zentrifugengläser à 50 ccm.

Glasreinigung: Um zuverlässige Werte zu erhalten, ist peinlichste Sauberkeit der Glaswaren Voraussetzung. Diese wurden von grobem Schmutz gereinigt, über Nacht in konzentrierte Schwefelsäure eingelegt, und dann mit heißem und kaltem Wasser gewaschen, mit Aqua dest. 3mal nachgespült, getrocknet und staubfrei aufbewahrt.

Reagentien: 1. Aqua bidestillata

2. Acidum trichloraceticum purissimum 20%

3. Ammonium hydricum solutum 25%

4. Natrium pyrophosphoricum pro analysi 4%

5. Amylalkohol purissimus

6. Natrium-Diäthylthiocarbamat (Merck)

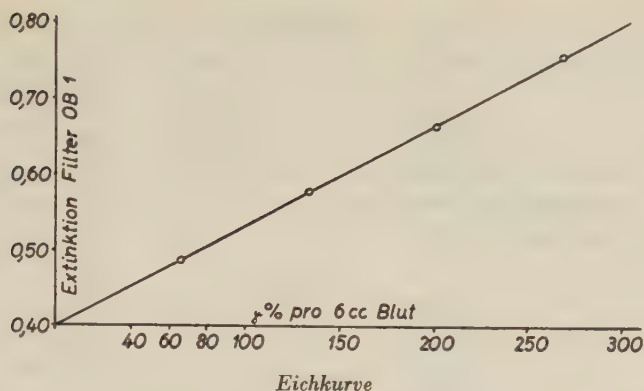
7. Filter Schleicher und Schüll 589³

Blutentnahme: Da bei der Blutentnahme mit Spritze sehr variable Werte entstehen, kommt einzig die direkte Entnahme mit einer trockenen Hohlneedle, wie der Strauß'schen Kanüle oder Massini-Nadel in Frage. Wir ließen zirka 10–20 ccm Blut aus der Cubitalvene direkt in ein 2 Tropfen Liquemin «Roche» enthaltendes Kölbchen ausfließen. Auf Nüchternblut wurde kein Gewicht gelegt, da sich bei den Blutkupferwerten keine Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme nachweisen läßt.

Methode: 6 ccm, durch Liquemin ungerinnbar gemachtes Vollblut werden in ein Erlenmeyerkölbchen abpipettiert. Dann wird mit 18 ccm Aqua dest. verdünnt, 6 ccm Trichloressigsäure langsam zugefügt, gut durchmischt, 10 Minuten stehen gelassen und 20 Minuten zentrifugiert oder filtriert. Von der überstehenden Flüssigkeit, resp. vom Filtrat werden 15 ccm in einen Schütteltrichter abpipettiert. Dazu werden 3 ccm Natriumpyrophosphatlösung, 1,5 ccm Ammoniak und 0,5 ccm 1%iger Natriumdiäthylthiocarbamatlösung zugesetzt. Diese Mischung wird unter Zusatz von 5 ccm Amylalkohol 1 Minute lang kräftig geschüttelt, und es wird etwa 20 Minuten bis zur völligen Abscheidung der Amylalkoholschicht zugewartet. Dann wird die untere Schicht abgelassen und der Amylalkohol zur Befreiung von noch beigemengtem Wasser durch ein Filter in das Spezialreagensglas abfiltriert. Parallel zur Blutkupferbestimmung wird eine Blindbestimmung durchgeführt, in der außer Blut alle Reagentien in der gleichen Menge wie angegeben verwendet werden. Natürlich werden dabei statt 15 ccm nur 12 ccm in den Schütteltrichter gegeben (die Hälfte von 18 ccm Aqua dest. und 6 ccm Trichloressigsäure).

Die Bestimmung der Farbintensität der gebildeten Kupfer-Natriumdiäthylthiocarbamatverbindung erfolgte im Hilger'schen «Biochem-Absorptiometer» auf photoelektrischem Wege. Dieses Instrument arbeitet nach folgendem Prinzip: das von einer konstanten Lichtquelle ausgesandte Licht wird nach Vorschalten eines geeigneten Filters – in diesem Falle des Blaufilters OB 1 – in der Farblösung, die vollkommen klar sein muß, teilweise absorbiert. Das durchtretende Licht wird von einer Photozelle aufgenommen und in einen elektrischen Strom verwandelt, der mit einem empfindlichen Galvanometer gemessen wird.

Zunächst wurde mit bekannten Kupfersulfatlösungen (mit 1,5 γ resp. 3 γ Cu pro ccm) eine Eichkurve hergestellt. Wie ihr Bild zeigt, bildet sie im Bereich der in Frage kommenden Konzentrationen eine Gerade, wenn die logarithmische Teilung der Galvanometerskala verwendet wird. Wiederholte Kontrollen dieser Kurve



mit andern Kupferlösungen ergaben eine Genauigkeit von $\pm 7\%$. Mit dieser Fehlergrenze gelang es auch, dem Serum zugesetzte Kupfermengen wieder zu finden.

B. Resultate

Die mathematische Behandlung der Untersuchungsergebnisse erfolgte nach *Linder*³³. Es bedeuten die nachfolgend erwähnten Symbole:

x = Einzelwert

N = Anzahl der Einzelwerte

N

Sx = Summe aus N -Einzelwerten

$\bar{x}$ = Durchschnittswert, errechnet nach der Formel $\bar{x} = \frac{Sx}{N}$

s = mittlere Abweichung, berechnet nach $s^2 = \frac{1}{N} (Sx^2 - \bar{x}Sx)$

Wir ordneten die untersuchten Personen in 4 Gruppen:

1. Normalpersonen

x_1	114 ‰	x_9	126 ‰
x_2	114 ‰	x_{10}	148 ‰
x_3	122 ‰	x_{11}	136 ‰
x_4	118 ‰	x_{12}	148 ‰
x_5	129 ‰	x_{13}	100 ‰
x_6	104 ‰	x_{14}	93 ‰
x_7	144 ‰	x_{15}	138 ‰
x_8	122 ‰		

Durchschnitt $\bar{x} = 124$ ‰

Mittlere Abweichung $s = 14,9$ ‰

2. Gravide

x_1	222 $\gamma\%$	x_6	165 $\gamma\%$
x_2	211 $\gamma\%$	x_7	137 $\gamma\%$
x_3	228 $\gamma\%$	x_8	183 $\gamma\%$
x_4	251 $\gamma\%$	x_9	177 $\gamma\%$
x_5	296 $\gamma\%$	x_{10}	200 $\gamma\%$
Durchschnitt $\bar{x}' = 207 \gamma\%$			
Mittlere Abweichung $s = 45,6 \gamma\%$			

3. Vitiligo

x_1	240 $\gamma\%$	x_5	124 $\gamma\%$
x_2	276 $\gamma\%$	x_6	118 $\gamma\%$
x_3	168 $\gamma\%$	x_7	114 $\gamma\%$
x_4	214 $\gamma\%$		
$\bar{x}'' = 179 \gamma\%$			
$s = 65,3 \gamma\%$			

4. Pigmentierungen

x_1	Riehl'sche Melanose	196 $\gamma\%$
x_2	do.	296 $\gamma\%$
x_3	Chloasma ohne Gravidität	268 $\gamma\%$
x_4	do.	319 $\gamma\%$
x_5	do.	190 $\gamma\%$
x_6	do.	146 $\gamma\%$
x_7	do.	214 $\gamma\%$
x_8	Porphyrie	220 $\gamma\%$
x_9	posttraumat. Hyperpigm.	148 $\gamma\%$
x_{10}	do.	350 $\gamma\%$
$\bar{x}''' = 234 \gamma\%$		
$s = 70,5 \gamma\%$		

Zur Prüfung der Frage, ob sich die gefundenen Durchschnittswerte der 4 Gruppen signifikant voneinander unterscheiden, oder ob es sich bei den zum Teil recht großen Streuungen der Durchschnittswerte um zufällige Differenzen handeln könnte, verwendeten wir ebenfalls das von *Linder* angegebene Verfahren der kleinen Stichprobe.

Aus der Formel $s_d^2 = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \cdot \left(\frac{S(x - \bar{x})^2}{N_1} + \frac{S(x' - \bar{x}')^2}{N_2} \right)$ wird zunächst s_d und dann aus der Formel $t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s_d} \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$ t berechnet

Mit Hilfe von t läßt sich schließlich aus der entsprechenden Tabelle das Maß der Wahrscheinlichkeit P ersehen, mit dem die betreffenden Durchschnitte auf Zufall beruhen. So bedeutet z. B. $P = 0,05$,

daß diese Wahrscheinlichkeit 5%, $P = 0,001$, daß sie $1\frac{0}{100}$ beträgt. Als Grenze der Signifikanz wird ein $P = 0,01$, das heißt eine Wahrscheinlichkeit von 1% angenommen.

Unsere Resultate ergaben nun folgende Werte von P :

Gruppe 1 der Normalpersonen unterscheidet sich sowohl von Gruppe 3 der Graviden, als von Gruppe 4 der Pigmentierungen signifikant, da in beiden Fällen ein P resultiert, das wesentlich kleiner als 0,001 ist.

Gruppe 3 unterscheidet sich von Gruppe 1 mit einem P zwischen 0,01 und 0,05 nicht signifikant, d. h. der gefundene Durchschnittswert bei den Vitiligofällen ist zufällig höher als der Normalwert.

Auch Gruppe 2 und 4 unterscheiden sich von Gruppe 3 nicht signifikant.

C. Diskussion der Resultate

Normalwerte

Wir fanden in der Literatur verschiedene Angaben. Die exakteste Bestimmung stammt wohl von *Heilmeyer*²⁵. Er findet für Frauen und Männer einen Durchschnitt von 106 $\gamma\%$. Mit derselben Methode erhielten *Schmidt*³⁴ 110–140 $\gamma\%$, *Neuweiler*²⁶ 115 $\gamma\%$, *Nielsen* und *Ravestejn*³⁵ 120 $\gamma\%$. Werte um 200 $\gamma\%$ geben *Tompsett*³⁶ und *McFarlane*³⁷ an, niedrigere *Locke*³⁸ 90 $\gamma\%$. Unsere Werte liegen also etwas höher als diejenigen von *Heilmeyer*. Dies dürfte vielleicht in einer etwas geringen Anzahl von Bestimmungen bei Normalpersonen liegen. Die Streuung des Mittelwertes liegt in derselben Größenordnung.

Gravide

Wir erhielten einen Durchschnitt von 207 $\gamma\%$. Dieser Wert entspricht demjenigen von *Neuweiler*²⁶ und *Heilmeyer*²⁵. Es ist uns nicht aufgefallen, daß die höheren Kupferwerte mit stärkerer Pigmentierung einhergehen, allerdings führten wir die Untersuchungen in den Monaten November bis März durch.

Vitiligo

Wir erhielten sowohl sehr hohe, wie normale Werte. Erniedrigte fanden wir nicht. x^1 und x^2 stammen von Patienten, die an einer Cholecystitis litten. Diese Erhöhung der Kupferwerte ist vielleicht auf einen Leberparenchymschaden zurückzuführen, entsprechend den Befunden von *Heilmeyer*²⁵ und *Fischer* und Mitarb.³⁹. x^4 stammt von einem Patienten mit Epilepsie.

Pigmentierungen

In allen 10 Fällen handelte es sich um nichtgravide Frauen, die Pigmentierungen mehr oder weniger schweren Grades zeigten. Bei Fall 2 und 4 bestand eine beträchtliche Erhöhung des Grundumsatzes. Die hier gefundenen Werte entsprechen der Angabe von *Rovello* ⁴⁰, daß bei thyreotoxischen Zuständen der Serumkupfergehalt erhöht ist. Bei den übrigen Patientinnen mit Chloasma fanden wir keine nachweisbaren innern oder äußern Ursachen für das Auftreten der Pigmentierung. Sensibilitätsstörungen fehlten. In einem Fall von Morbus Addison mit nicht sehr ausgeprägter Pigmentierung wurde ein normaler Kupferwert gefunden.

D. Schlußfolgerungen

Wir dürfen aus den erhaltenen Zahlen wohl folgendes ableiten: Die Tatsache, daß der Serumkupfergehalt bei Vitiligopatienten nicht signifikant vom normalen Durchschnitt abweicht, spricht dafür, daß die Depigmentierung nicht auf einem Kupfermangel beruht, sondern daß andere, vorerst nicht abgeklärte Faktoren die Ursache sind. Allerdings ist die Zahl unserer Untersuchungen sehr klein und wir wollen deshalb keine weiteren Schlüsse daraus ziehen.

Bei Graviden hat sich die bereits festgestellte Erhöhung des Serumkupfergehaltes eindeutig bestätigen lassen. Ebenso haben wir bei einer Anzahl idiopathischer Hyperpigmentierungen, wie der Riehl'schen Melanose und dem genuinen Gesichtschloasma eine signifikante Erhöhung der Kupferwerte im Blut gefunden. Hier könnte somit dem Kupfer sehr wohl eine Bedeutung für ihre Entstehung zukommen. Denn da wir nach den heutigen Kenntnissen wohl berechtigt sind, die Melanogenese dem Zusammenspiel folgender Faktoren zuzuschreiben:

- a) der farblosen Pigmentvorstufe
- b) einem Ferment
- c) dem Kupfer
- d) dem Sauerstoff

kann vermutet werden, daß der Überschuß oder das Fehlen eines dieser Faktoren die Anomalien der Pigmentbildung bedingen. Im Falle der mit Kupfererhöhung im Blut einhergehenden Hyperpigmentierungen wäre der Überschuß an Kupfer bei sonst normalen Verhältnissen die Ursache, während bei Vitiligo ein anderer Faktor fehlen dürfte. Schematisch läßt sich diese Ansicht folgendermaßen darstellen:

Klin. Resultat wenn zu wenig vorhanden	Faktoren	Klin. Resultat wenn zu viel vorhanden
	Pigmentvorstufe	Addison-Pigmentierung (<i>Bloch</i>)
Vitiligo	Ferment	
Depigmentierung bei <i>Antu</i> -Vergiftung Exp. Kupfermangel	Kupfer	Graviditätspigmentierung Chloasma ohne Gravidität Riehl'sche Melanose
Vitiligo (<i>Robert</i> ⁴¹) Depigmentierung bei Hydrochinonvergiftung	Sauerstoff	

Natürlich kann dieses Schema die Verhältnisse nur ganz grob darstellen, indem wir über verschiedene weitere Faktoren, die sicher auch mit eine Rolle spielen, noch gar nicht orientiert sind. So sind die Bedingungen, die über die Verwertung des Sauerstoffs im Gewebe entscheiden, die Redox-Potentiale der Haut noch kaum untersucht worden. Es kann uns aber doch einen Eindruck davon vermitteln, auf welchem komplexen Wege eine scheinbar so einfache Funktion, wie die Pigmentbildung, zustande kommt.

Zusammenfassung

Eine Nachuntersuchung der Angabe *Zellers*, daß durch die Einwirkung von Histaminase auf Histamin ein dunkler Farbstoff entstehe, ergab nur negative Resultate. Die Annahme, dieses Ferment-system könne bei der Pigmentbildung in der Haut eine Rolle spielen, erscheint deshalb wenig wahrscheinlich. Auf jeden Fall bedarf diese Frage weiterer Abklärung.

Zur Frage der Bedeutung des Kupfers für die Pigmentgenese wurden Bestimmungen des Kupfergehaltes des Blutes vorgenommen. Bei Vitiligo ergaben sich durchschnittlich normale, auf jeden Fall nicht verminderte Werte. Bei Riehl'scher Melanose und Chloasma auch ohne Gravidität waren sie dagegen regelmäßig erhöht, so daß für diese beiden Affektionen die Erhöhung des Kupfers im Blut eine ätiologische Bedeutung haben könnte.

Summary

An investigation to control the statement of *Zeller*, that a dark colour is formed by the action of histaminase on histamin, only had

negative results. The supposition that this ferment-system might play some part in the pigmentation of the skin therefore seems improbable. In any case the question calls for further clarification. To decide the question of the significance of copper for the genesis of pigment, determinations of the copper content of the blood were made. In vitiligo, the values obtained were normal on the average and in any case not decreased. On the other hand, in Riehl's melanosis and in chloasmas (without gravidity), the values were always increased, so that for these two illnesses the increase of copper in the blood could have an aetiological significance.

Résumé

On s'est donné pour tâche dans ce travail, de contrôler, si, comme l'a prétendu Zeller, l'histaminase donne lieu à la formation d'un colorant noir en agissant sur l'histamine. Les résultats obtenus ont tous été négatifs. Il paraît donc peu probable que ce système fermentatif puisse jouer un rôle dans la formation du pigment cutané. Cette question demande en tout cas à être encore éclaircie. A propos de l'importance qu'a le cuivre dans la formation du pigment, l'auteur a procédé à des déterminations de la teneur en cuivre du sang. Dans le vitiligo, les valeurs trouvées sont normales en moyenne. Il n'y a en tout cas pas d'abaissement. Par contre, dans la mélanose de Riehl et dans le chloasma (même en dehors d'une gravidité) la cuprémie est régulièrement trop élevée si bien que l'augmentation du cuivre pourrait avoir une signification étiologique dans ces 2 affections.

Literaturverzeichnis

- ¹ Bloch, Handbuch d. H. u. Gkh. v. Jadassohn, Bd. II, 434, Springer, Berlin 1927.
- ² Meirowsky: Brit. J. Derm. 52, 205, 1940. — ³ Zeller: Helv. Chim. Acta 21, 880, 1938. — ⁴ Robert und Zeller: Schw. med. Wschr. 71, 1605, 1941. — ⁵ Robert und Strehler: Dermatologica 91, 1, 1945. — ⁶ Zeller: Phil. Diss. 189, Universitätsbibliothek Basel, 1937. — ⁷ Cohen und Elvehjem: J. Biol. Chem. 107, 97, 1934. — ⁸ Graubard: Am. J. Physiol. 131, 584, 1941. — ⁹ McCarthy, Green und King: J. Biol. Chem. 128, 455, 1939. — ¹⁰ Schultze: J. Biol. Chem. 138, 219, 1941. — ¹¹ Keil und Nelson: J. Biol. Chem. 94, 49, 1931. — ¹² Gorter: Nature 136, 185, 1935. — ¹³ Cunningham: Bioch. J. 25, 1267, 1931. — ¹⁴ Sarata: Jap. J. Med. Sc. II Bioch. 3, 79, 1935. — ¹⁵ Yosikawa: Jap. J. Med. Sc. II Bioch. 3, 195, 1937. — ¹⁶ Cohen: Trav. Membr. Soc. Chim. biol. 23, 1504, 1941. — ¹⁷ Flesch: J. invest. Derm. 11, 157, 1948. — ¹⁸ Schuppli: Dermatologica 100, 242, 1950. — ¹⁹ Robert: Dermatologica 100, 217, 1950. — ²⁰ Robert: Schweiz. Z. Path. u. Bakt. 10, 74, 1947. — ²¹ Cornbleet: Arch. Derm. Syph. 35, 471, 1935. — ²² Schaaf: Arch. f. Derm. 176, 646, 1938. — ²³ Graciansky: Ann. Derm. Syph. 1945, 125. — ²⁴ Krebs: Klin. Wschr. 1928, 584. — ²⁵ Heilmeyer: Kupfer und

Eisen als körpereigene Wirkstoffe, Jena 1941. — ²⁶ *Neuweiler*: *Helv. med. acta* 10, 619, 1943. — ²⁷ *Shaffer*: *J. invest. Derm.* 1, 225, 1938. — ²⁸ *Richter*: *J. Am. Med. Ass.* 129, 927, 1945. — ²⁹ *Dubois und Erway*: *J. Biol. Chem.* 165, 711, 1946. — ³⁰ *Rothman*: *Krysa und Smiljanic*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 62, 208, 1946. — ³¹ *Figge*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46, 269, 1941. — ³² *Callan und Henderson*: *Analyst* 1929, 54. — ³³ *Linder*: *Statistische Methoden*, Birkhäuser, Basel, 1945. — ³⁴ *Schmidt*: *Biochem. Z.* 1939, 302. — ³⁵ *Nielsen und Ravestejn*: *Acta med. scand.* 118, 172, 1944. — ³⁶ *Tompsett*: *Bioch. J.* 28, 1934; cit. *Heilmeyer* ²⁵, 20. — ³⁷ *McFarlane*: *Bioch. J.* 26, 1932, cit. *Heilmeyer* ²⁵, 30. — ³⁸ *Locke*: *J. clin. Invest.* 11, 1932, cit. *Heilmeyer* ²⁵, 30. — ³⁹ *Fischer, Georgi, Weber, Piaget*: *Schw. med. Wschr.* 80, 133, 1950. — ⁴⁰ *Rovello*: *Arch. sci. med.* 4, 15, 1949. — ⁴¹ *Robert*: *Dermatologica* 84, 257, 1941.

